

FATORES DE CONFUSÃO EM ECOTOXICOLOGIA: REVISÃO DO EFEITO DE SOLVENTES ORGÂNICOS EM *DAPHNIA MAGNA*

Guilherme Braga

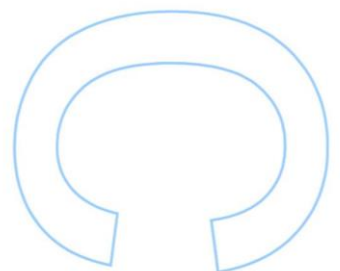
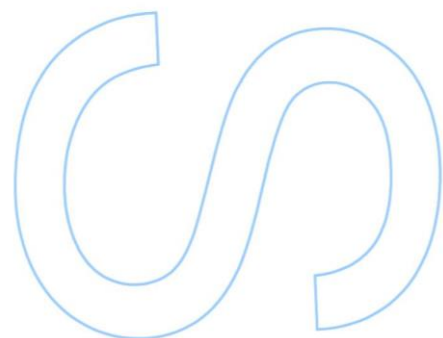
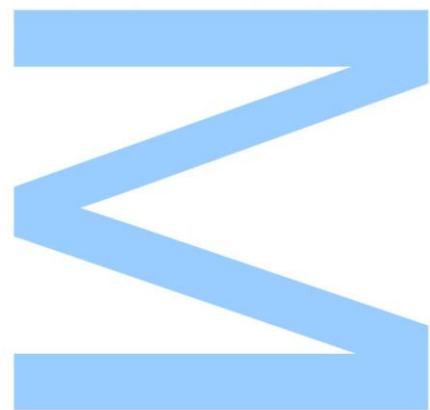
Mestrado em Ecologia e Ambiente
Departamento de Biologia
2017

Orientador

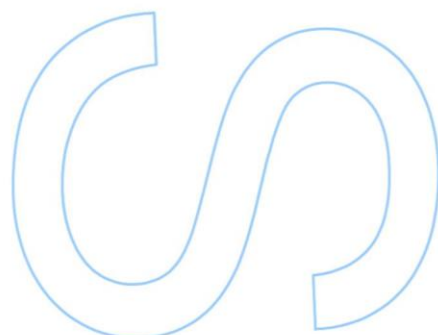
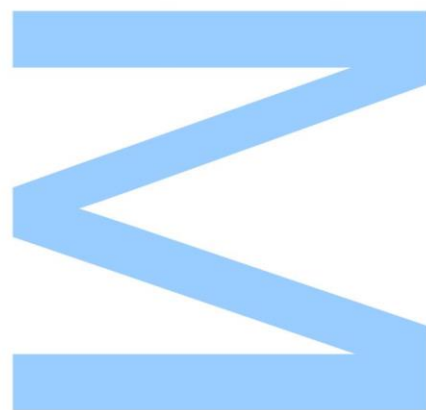
Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Professora Auxiliar
Convidada no Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto e Investigadora de Pós-Doutoramento do CIIMAR

Coorientador

Doutor Bruno Branco Castro, Professor Auxiliar no Departamento de
Biologia da Universidade do Minho



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,
Porto, ____/____/____



Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia Ambiente e Território, da responsabilidade do Departamento de Biologia.

A presente tese foi desenvolvida sob a orientação científica da Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da FCUP e Investigadora em Pós-Doutoramento no CIIMAR; e coorientação científica do Doutor Bruno Branco Castro, Professor Auxiliar no Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Doutora Sara Antunes e ao meu co-orientador Prof^o. Doutor Bruno Castro, por todo o apoio prático e científico, por todas as horas de explicação e por toda a paciência e motivação dada ao longo deste ano de trabalho. Principalmente à professora Sara por não me deixar cair e insistir comigo e dar-me na cabeça quando eu precisei.

Aos colegas do laboratório 1.14 por todos os momentos de convívio e ajuda mútua, especialmente à Conceição Marinho por toda a ajuda que me deu durante a realização dos trabalhos práticos para este estudo.

À minha família, principalmente aos meus pais por me terem posto na Faculdade e permitido que eu conseguisse licenciar-me e tirar mestrado.

E por fim, à Marlisa, a minha namorada, por toda a motivação que me deu, toda a paciência e companhia nos fins de semana durante os ensaios.

RESUMO

Solventes orgânicos são frequentemente utilizados para ajudar a dissolver substâncias pouco solúveis em ensaios de ecotoxicologia aquática. Este uso é referido em protocolos e é limitado a um valor que no caso do teste generalizado de toxicidade de *Daphnia* é fixado em 100 µL/L. No entanto, poucos estudos testaram efetivamente o efeito dos solventes mais utilizados (etanol, acetona, entre outros), ou a sua interação com a toxicidade da substância sob teste. O objetivo deste estudo pretende (i) avaliar os efeitos de dois dos solventes mais usados, etanol e acetona, nos parâmetros da história de vida de *D. magna* e (ii) avaliar os possíveis efeitos de interação entre solventes e tóxicos selecionados (o fármaco paracetamol e o agroquímico tebuconazol). Estes tóxicos foram escolhidos por terem origens diferentes, o paracetamol se dissolve facilmente em água, e o tebuconazol ter de se recorrer a um solvente orgânico para a sua dissolução. Numa primeira fase experimental, foram realizados testes de toxicidade crónica com *D. magna*, seguindo o protocolo padronizado da Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Económica. Foram utilizadas séries geométricas de seis concentrações de ambos os solventes (desde 12,5 µL/L até 400 µL/L) e os parâmetros da história de vida da *D. magna* foram comparados com um controlo negativo. Numa segunda fase, foram utilizadas 4 concentrações de paracetamol (0; 1,3; 2,25; 3,9 mg/L) e tebuconazol (0; 125; 250; 500 µL/L) combinadas com 3 concentrações de etanol (0 µL/L, 25 µL/L e 100 µL/L). As concentrações de tóxico foram escolhidas através de valores de EC₅₀ verificados na bibliografia. Nos ensaios apenas com os solventes, não foram registadas diferenças significativas na exposição a qualquer das concentrações de etanol ou acetona, mesmo a níveis superiores aos admitidos pelos protocolos padronizados. Relativamente aos ensaios com os tóxicos, apenas num caso se registou uma interação significativa entre o efeito do etanol e do tóxico (idade à primeira reprodução no caso do tebuconazol). Surpreendentemente, e ao contrário do observado na primeira fase experimental, observou-se em quase todos os casos um efeito significativo apenas do solvente (etanol) na concentração mais alta (100 µL/L). No caso do paracetamol, não foram observados efeitos deste fármaco nas respostas de *D. magna*, nas concentrações testadas. Nos ensaios com tebuconazol, este provocou uma diminuição significativa no output reprodutivo e na taxa de incremento populacional quando os organismos foram expostos à concentração mais alta de tóxico (500 µg/L), independentemente da concentração de etanol. Os resultados desta tese demonstram que os solventes etanol e acetona não interferiram com o desempenho reprodutivo de *D. magna* nem com a toxicidade da substância a testar. Todavia, pode haver – em alguns casos – um ligeiro efeito (de inibição ou estimulação) que pode gerar alguma

incerteza na interpretação dos resultados (ex.: no caso do tebuconazol). De forma a evitar esta fonte de “confusão”, recomenda-se evitar uma concentração de etanol perto do limite máximo recomendado (100 µL/L) em ensaios toxicológicos com *D. magna*. É necessário continuar a investigar compostos diferentes (tóxicos e solventes), de modo a se perceber quais as possíveis interações e os seus efeitos nos organismos-teste.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicologia; Solventes; *Daphnia magna*; ensaio de toxicidade crónica; paracetamol; tebuconazol

ABSTRACT

Organic solvents or carriers are often used to help dissolve sparingly soluble substances in aquatic ecotoxicology trials. This use is referred to in protocols and is limited to a value, which in the case of the generalized *Daphnia* toxicity test is set to 100 $\mu\text{L/L}$. However, few are the studies that have effectively tested the effect of the most used carriers (ethanol, acetone) or its interactions with toxic substances. The objective of this study is (i) to evaluate the effects of two of the most commonly used solvents, ethanol and acetone, on the life history parameters of *D. magna* and (ii) to evaluate the possible interactive effects between solvents and selected toxicants (the drug paracetamol and the fungicide tebuconazole). These two toxics were used for their different origin, paracetamol can be dissolved in water easily, and tebuconazole cannot. In a first experimental step, chronic toxicity tests were performed with *D. magna*, following the OECD standard protocol. Geometric series of six concentrations of each solvent (from 12.5 $\mu\text{L/L}$ to 400 $\mu\text{L/L}$) were used, and the life history parameters of *D. magna* were compared with a negative control. In a second experimental step, four concentrations of paracetamol (0, 1.3, 2.25, 3.9 mg/L) and tebuconazole (0, 125, 250, 500 $\mu\text{L/L}$) were used in combination with three ethanol concentrations (0 $\mu\text{L/L}$, 25 $\mu\text{L/L}$ and 100 $\mu\text{L/L}$). Toxic concentrations were chosen by the values of EC50 that can be found in the bibliography. In the solvent-only assay, no significant differences were registered in any of the solvent concentrations, even at levels superior than the established by the OECD protocol. Regarding the toxicity tests, only in one case there was a significant interaction between the effect of ethanol and the toxicant (age at first reproduction for the tebuconazole). Surprisingly, and contrary to the observed in the first experimental step, in almost all the cases a significant effect of only the solvent (ethanol) was observed at the highest concentration (100 $\mu\text{L/L}$). In the paracetamol assay, no effects of this drug were observed in the response of *D. magna*. In the case of tebuconazole, significant decrease in reproductive output and population increment rate were recorded at the highest concentration of the toxicant (500 $\mu\text{g/L}$), independent of the carrier concentration. These results showed that ethanol and acetone did not interfere with the reproductive performance of *D. magna* or with the toxicity of the test substance. However, a small effect (stimulation or inhibition) may happen sometimes, leading to uncertainty in the interpretation of results. To avoid this source of “confusion”, it is recommended to use a solvent concentration below the recommended threshold (100 $\mu\text{L/L}$) in *D. magna* chronic assays. More studies are needed with different compounds (toxicants and carriers), in order to understand the possible interactions and their effects on test organisms.

KEYWORDS: Ecotoxicology; Solvents; *Daphnia magna*; chronic toxicity assay; paracetamol; tebuconazol

Índice

Lista de Abreviaturas	V
1. Introdução.....	1
1.1 Avaliação ecotoxicológica.....	3
1.2. Objetivo.....	7
2. Materiais e métodos	8
2.1. Solventes e tóxicos.....	8
2.2. Organismo modelo	8
2.3. Primeira Fase Experimental: efeito isolado de solventes.....	10
2.4. Segunda Fase Experimental: efeito interativo entre etanol e tóxicos selecionados.....	11
2.5. Análise estatística.....	12
3. Resultados.....	13
3.1. Primeira Fase Experimental: efeito isolado de solventes.....	13
3.2 Segunda Fase Experimental: efeito interativo entre etanol e tóxicos selecionados.....	15
4. Discussão.....	20
5. Conclusão.....	24
6. Bibliografia.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – do acrónimo em inglês Analysis of Variance (Variância de análises)

ASTM – Do acrónimo em inglês American Society for Testing and Materials

EC50 – Do acrónimo em inglês Effective Concentration for 50% organisms

EC100 – Do acrónimo em inglês Effective Concentration for 100% organisms

NOEC – Do acrónimo em inglês Non Observable Effective Concentration

EPA – Environmental Protection Agency

ISO – International Organization for Standardization

LC50 – Do acrónimo em inglês Letal Concentration for 50% organisms

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

Koc – Coeficiente de adsorção

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população, os novos métodos de prevenção de doenças, as formas de garantir alimentos saudáveis e de maximizar a produção dos mesmos, são alguns exemplos responsáveis pelo aumento da produção de xenobióticos - compostos produzidos não naturalmente, e que são substâncias estranhas a um organismo ou a um sistema biológico (Rand and Petrocelli, 1985; Newman, 2009). Estes são agentes químicos de origem antrópica cujas concentrações no ambiente têm vindo a aumentar (Pimentel, 1996; Carvalho, 2006). Xenobióticos entram nos ecossistemas de forma contínua e persistente. Estes compostos podem ter origens diversas, podendo ser de origem orgânica, com atividade biológica específica, como por exemplo modificação de funções endócrinas, ou de origem inorgânica, que podem ser divididos em metais, não-metais e metaloides, que são formados por venenos intencionais ou não intencionais (Newman, 2009). A sua ocorrência nos ecossistemas pode provocar alterações significativas nos organismos. Por outro lado, a entrada destas substâncias nos ecossistemas é muito mais rápida do que a sua degradação levando à sua acumulação e persistência no ambiente ou nos organismos. Bioacumulação – acumulação de um ou mais contaminantes num organismo, provenientes de substâncias provenientes da água, ar ou substâncias em estado sólido no ambiente, por exemplo o alimento, o solo, sedimentos ou partículas em suspensão na água ou no ar, - e bioconcentração – acumulação de um ou mais tóxicos num organismo apenas através da água (Newman, 2009). Esta contaminação leva a que ocorram diversos efeitos adversos já registados nos organismos, no funcionamento dos ecossistemas e também na saúde humana (Newman, 2009; Freches, 2015).

O atual uso generalizado de fármacos para tratamento de doenças de origem humana ou veterinária, tem levado a uma crescente contaminação dos ecossistemas aquáticos (Nunes et al., 2014). Um dos fármacos mais utilizados e comumente encontrado em ambientes aquáticos é o paracetamol (N-acetil-p-aminofenol, também conhecido por acetaminofeno) (Nunes et al., 2014). Paracetamol é um dos produtos farmacêuticos mais vendidos mundialmente, sendo utilizado como analgésico e antipirético com fins medicinais e de terapia na diminuição da febre e no alívio de dores ligeiras e moderadas (Nunes et al., 2014). Este tóxico entra no ecossistema aquático através de esgotos urbanos, resíduos provenientes de veterinária, instalações de aquacultura, descargas industriais e resíduos hospitalares. Paracetamol já foi detetado no ambiente em concentrações de 6 µg/L em efluentes de sistemas de tratamento de águas europeias (Ternes, 1998), até 10 µg/L em águas naturais nos Estados Unidos da

América (Kolpin et al., 2002) e acima de 65 µg/L no Rio Tyne em Inglaterra (Roberts and Thomas, 2006). Paracetamol tem uma solubilidade bastante alta em água a 20°C (12,7 g/L), mas esta solubilidade é muito superior em solventes polares, como por exemplo acetona e etanol (88,09 g/L; 190,61 g/L, respetivamente; Granberg & Rasmuson, 1999). É um xenobiótico que pode causar hepatotoxicidade tanto em peixes como em humanos e, para o cladóceros *Daphnia* sp. é mortal em concentrações iguais ou superiores a 1,2 mg/L (Nunes et al., 2014). Nunes et al. (2014) demonstraram que o paracetamol é tóxico para várias espécies, registando que os dafniídeos foram os mais sensíveis a este fármaco. Freches (2015) demonstrou que a toxicidade aguda de paracetamol para *Daphnia magna* se registou acima dos 4 mg/L. Na avaliação da toxicidade crónica para paracetamol, Freches (2015) registou ainda que em concentrações entre 2 e 4 mg/L houve um atraso significativo da idade à primeira reprodução e uma diminuição da taxa de incremento populacional a partir da concentração de 2 mg/L.

Para além da contaminação do ambiente aquático proveniente do uso diário de fármacos e outros produtos de cuidado pessoal, a contaminação por agroquímicos (pesticidas, incluindo inseticidas, herbicidas e fungicidas) é outra ameaça recorrente nos ecossistemas aquáticos atualmente. Tebuconazol é um fungicida de uso agrícola, utilizado em diversas culturas, incluindo vinha, arroz, aveia, banana, café, cenoura, cevada, citrinos, feijão, soja, tomate, trigo (Silveira, 2012; Cuco et al., 2016; Cuco et al., 2017). Este fungicida atinge as águas superficiais através de escoamentos, lixiviação ou deriva aérea (dispersão de tóxicos em campos agrícolas através de um avião) (Cuco et al., 2017). Tebuconazol pertence à família dos azoles (triazol) e tem a fórmula molecular de C₁₆H₂₂ClN₃O (Zubrod et al., 2010; Silveira 2012). O principal mecanismo de ação deste tóxico consiste na inibição da produção de ergosterol, principal esteroide da membrana plasmática dos fungos. Este esteroide é importante na manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana, e, por conseguinte, na sua ausência ocorre morte celular (Sheehan et al., 1999; Toni et al., 2011; Silveira 2012). O tebuconazol é um composto tóxico e pode causar efeitos na saúde humana (irritação cutânea, ocular e respiratória), para além de ser tóxico para muitos organismos aquáticos não-alvo, o que acarreta efeitos nefastos nos ecossistemas aquáticos, podendo afetar a sua estrutura e funcionamento (Verdisson et al., 2001; Zubrod et al., 2010; Silveira 2012). Em termos ambientais, tebuconazol já foi registado em rios, águas residuais e lagos em concentrações até os 9,1 µg/L (Berenzen et al., 2005; Kahle et al., 2008), o que ultrapassa o limite estabelecido na União Europeia de 0,1 µg/L (Herrero-Hernández et al., 2011). Tebuconazol tem uma solubilidade muito baixa em água, cerca de 32 mg/L à temperatura ambiente, o que se reflete numa necessidade de, em alguns ensaios, se usarem solventes como auxiliar na dissolução deste tóxico, sobretudo em

concentrações-stock (Cuco et al., 2016). Segundo Zubrod et al. (2010), *Gammarus fossarum* (crustáceo, semelhante a um camarão) apresentou uma diminuição na alimentação após exposição a este fungicida à concentração de 600 µg/L. Toni et al. (2011) demonstraram que concentrações entre os 31,95 µg/L e os 36,23 µg/L de tebuconazol (consoante testes de campo ou laboratório, respetivamente) provocaram alterações no metabolismo de carpas (*Cyprinus carpio*). Silveira (2012) testou este fungicida em 4 espécies de fitoplâncton, demonstrando que a concentrações acima dos 500 µg/L se registou uma inibição no crescimento destas espécies. Cuco et al. (2016) testaram tebuconazol sob 3 condições de temperatura em *Daphnia* e registaram que este fungicida causou efeitos negativos nas 3 temperaturas, nomeadamente um aumento da mortalidade, um atraso na idade à primeira reprodução e diminuição da fecundidade e do output reprodutivo.

1.1. Avaliação ecotoxicológica

Durante vários anos, foram várias as definições da ecotoxicologia ou toxicologia ambiental. Muitas delas definiam esta ciência como o estudo dos efeitos de substâncias tóxicas no ambiente, e os seus integrantes, excluindo os humanos, pois estes eram apenas a fonte destas substâncias tóxicas (Dufus, 1980; Moriarty, 1983; Forbes and Forbes, 1994; Hoffman, 1995). Esta visão veio a ser atualizada, mais tarde, com Newman (2009) que relembrou a definição original dada por Truhaut (1977), onde os humanos também entram na equação, não só como fonte das substâncias tóxicas, mas também como alvo do efeito destas.

Qualquer substância química que tenha potencial tóxico e com probabilidade de entrar no ambiente (exemplo: pesticidas, herbicidas, fármacos) tem de ser testada em ensaios toxicológicos padronizados em ambiente laboratorial (ex: normas ISO, OECD, EPA), para avaliar possíveis efeitos no biota, para poder ser aprovada para venda. Estes ensaios consistem na avaliação dos efeitos da exposição ao tóxico num conjunto de espécies modelo (Green, 2014). Estes ensaios são classificados em função do tempo de exposição e dos efeitos que podem ser avaliados. Podemos, desta forma, ter ensaios de toxicidade aguda, que avaliam exposições curtas com concentrações mais elevadas do tóxico e onde normalmente se avalia a mortalidade. E por outro lado, temos os ensaios de toxicidade crónica, que avaliam exposições longas, normalmente com concentrações mais baixas do tóxico, e os efeitos avaliados são variados (reprodutivos, bioquímicos, comportamentais) (Freches, 2015).

A natureza química dos compostos é distinta, sendo alguns hidrofóbicos, que dificilmente se dissolvem em água e outros que são hidrofílicos, com elevada solubilidade em água. Na primeira situação, a avaliação ecotoxicológica destes compostos tem de ser efetuada recorrendo a métodos físicos ou químicos para que haja uma dissolução efetiva destes compostos. A utilização de solventes orgânicos para a dissolução dessas substâncias é o método mais utilizado que permite obter uma solução homogénea, sendo que o solvente funciona como um facilitador para a posterior dissolução do composto em meio aquoso. O protocolo padronizado para a avaliação na reprodução de *Daphnia magna* da OECD (2012) recomenda a utilização de métodos físicos (agitação, ultrasonicação ou colunas de saturação) na preparação destas soluções. Recomenda ainda que estes métodos devem ser utilizados em detrimento dos métodos químicos, mas reconhecendo que em muitos casos estes últimos são os mais eficazes (no caso de tóxicos hidrofóbicos). Efetivamente, os solventes são uma opção mais viável nas situações em que não há outra alternativa prática para testar substâncias hidrofóbicas. No entanto, e de modo a avaliar o efeito dos solventes nas espécies expostas, os testes recomendam a utilização de um controlo com os solventes utilizados (Hutchinson et al., 2006; OECD, 2012). Mais ainda, o protocolo padronizado da OECD (2012) recomenda que os solventes utilizados nos ensaios ecotoxicológicos não deverão causar efeitos nos organismos teste. Os solventes comumente utilizados e indicados no protocolo OECD (2012) são o etanol, a acetona, o metanol, a dimetilformamida, o trietileno glicol e o DMSO. Estes foram já testados em diferentes organismos padrão onde apresentaram efeitos mínimos ou nulos sob os organismos teste (Leblanc & Suprenant, 1983). O protocolo OECD (2012) ressalva ainda que a concentração final destes solventes nunca deverá ultrapassar o limite estipulado de 0,1 mL/L (OECD, 2012).

Green & Wheeler (2013), em experiências ao longo dos vários anos com diferentes organismos (algas, crustáceos e peixes), demonstraram que a utilização de solventes à concentração recomendada no protocolo padronizado não causa efeitos sobre os organismos-teste. No entanto, os mesmos autores constataram também que é comum observar diferenças significativas entre os solventes e o controlo positivo, particularmente em exposições crónicas. Assim, é perceptível que este assunto levante controvérsia, pois diversos estudos apresentam resultados contraditórios em relação ao possível efeito dos solventes nos organismos-teste (Leblanc & Suprenant, 1983; Cowgill & Millazo, 1991; Comber et al., 1993; Zhang & Baer, 2000; Hutchinson et al., 2006). Alguns estudos demonstram que o uso de solventes não provoca qualquer efeito nos organismos expostos (Leblanc & Suprenant, 1983; Comber et al., 1993), enquanto outros estudos apresentam resultados onde os efeitos provocados pelos mesmos

solventes são significativos (Cowgill & Millazo, 1991; Zhang & Baer, 2000; Hutchinson et al., 2006). Leblanc & Suprenant (1983) observaram que não existe um aumento significativo da mortalidade de *Daphnia magna* após exposição crônica a 1,4 e 2,8 mL/L de acetona. Contrariamente, Cowgill & Millazo (1991) observaram que o valor da concentração tóxica observável que não apresenta efeitos (NOEC) para *D. magna* era menor que 0,51 mL/L após uma exposição de 11 dias a acetona. Zhang & Baer (2000) demonstraram que à concentração de 0,1 mL/L de acetona, *Daphnia magna* apresentou uma alteração na reprodução, havendo um aumento na fecundidade e na produção de machos, quando expostas a uma baixa disponibilidade alimentar. Também demonstraram que este efeito foi observado para etanol, onde se registou o aumento da fecundidade quando *D. magna* exposta ao mesmo regime alimentar. Por outro lado, Comber et. al (1993) não observaram qualquer alteração na fecundidade de *D. magna* para concentrações de 0,09 mL/L de acetona (Leoni et al, 2008). Hutchinson et. al (2006) apresentaram a hipótese de que os solventes são uma fonte adicional de nutrientes para a comunidade microbiana, o que aumenta o alimento disponível para os organismos teste, podendo alterar as condições (melhorar ou piorar) em que estes últimos se encontram de forma indireta, dependendo sempre do organismo a testar e das condições experimentais dos ensaios. Em suma, e de acordo com vários estudos, apesar de a concentração de solventes recomendada no protocolo não ser letal, estes podem provocar efeitos na história de vida dos organismos. Nomeadamente, isto tem sido observado em *Daphnia magna*, onde se registou um aumento ou diminuição da fecundidade, estimulação ou inibição da produção de machos (Cowgill & Millazo, 1991; Zhang & Baer, 2000; Hutchinson et al., 2006). A observação destes efeitos em organismos padrão é importante uma vez que poderão influenciar os resultados obtidos em ensaios de toxicidade e avaliação de efeitos de compostos.

Para além dos efeitos apresentados dos solventes sob os organismos teste, é importante perceber se existem efeitos resultantes da interação entre o solvente e o tóxico. Zhang et al. (2003) demonstraram que poderá haver um efeito sinérgico entre o etanol e o tóxico 4-nonilfenol, tanto na toxicidade aguda como na produção de machos em *D. magna*. Estes resultados sugerem que os resultados obtidos nos testes toxicológicos podem ser alterados quando solventes são utilizados para dissolver as substâncias a testar, devido a esta possível interação entre estas duas substâncias. Estas alterações podem ser sinérgicas ou antagónicas, podendo superestimar ou subestimar a respetiva toxicidade intrínseca da substância a testar. Podem ainda causar efeitos diretos ou indiretos, sendo os últimos de menor preocupação, por exemplo os solventes podem providenciar uma fonte de carbono adicional para o crescimento microbiano, que oferece uma fonte de alimento extra ao organismo teste. Esse

crescimento microbial pode também afetar negativamente o sistema do ensaio ao consumir oxigénio dissolvido ou até mesmo influenciando a taxa de degradação do tóxico a testar (Green & Wheeler, 2013). Outro exemplo plausível é o aumento da biodisponibilidade do tóxico a ser testado, aumentando potencialmente a expressão da toxicidade. Geralmente, efeitos deste tipo têm tendência a aumentar a toxicidade em vez de diminuí-la. Assim, a interpretação dos resultados obtidos torna-se difícil de explicar e a sua extrapolação para casos reais é significativamente comprometida. Mas são poucos os estudos que comprovaram a existência destes efeitos interativos para concentrações de solvente tão baixas, como as estipuladas pelos protocolos padrão da OECD (Green & Wheeler, 2013). Nesse sentido, torna-se importante perceber melhor a influência da utilização de solventes em ensaios ecotoxicológicos.

1.2. Objetivos

De acordo com a problemática apresentada e contrariedade de opiniões acerca do uso dos solventes em ensaios de toxicidade e das suas concentrações limites aceitáveis, os objetivos do presente estudo foram:

- avaliar o efeito dos solventes etanol e acetona na história de vida de *Daphnia magna*.
- avaliar a possibilidade da ocorrência de efeitos resultantes da interação entre a utilização de um solvente (etanol) na avaliação de dois tóxicos (paracetamol e tebuconazol) na história de vida de *Daphnia magna*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Solventes e tóxicos

Os solventes utilizados no presente estudo foram o etanol e a acetona. Os dois solventes foram adquiridos à empresa Sigma-aldrich: etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$; CAS: 64-17-5) com 99,8% de pureza, e acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$; CAS: 67-64-1) com 99,9% de pureza.

As concentrações utilizadas para testar o efeito destes solventes na história de vida de *Daphnia magna* foram definidas tendo como base a concentração limite recomendada no protocolo padronizado da OECD (2012) - 100 $\mu\text{L/L}$. Adicionalmente, foram ainda definidas um conjunto de outras concentrações acima e abaixo deste limite (a partir da informação na bibliografia consultada): 0 $\mu\text{L/L}$ (ctl); 12,5 $\mu\text{L/L}$; 25 $\mu\text{L/L}$; 50 $\mu\text{L/L}$; 200 $\mu\text{L/L}$ e 400 $\mu\text{L/L}$ (Zhang & Baer, 2000; Hutchinson et al., 2006). Os solventes foram adicionados diretamente ao meio de cultura de acordo a se obter as concentrações desejadas.

Os tóxicos utilizados para responder ao segundo objetivo da presente tese foram o paracetamol e o tebuconazol. Por razões logísticas, esta etapa experimental foi restringida a apenas um solvente (etanol), que foi escolhido com base nos resultados obtidos na primeira fase experimental, nas concentrações 0 $\mu\text{L/L}$, 25 $\mu\text{L/L}$ e 100 $\mu\text{L/L}$. O EC_{50} do paracetamol, para *D. magna*, é de 4,750 mg/L (Freches, 2015) e o HC_5 é de 7,6 mg/L (Nunes et al., 2014). Estes valores serviram de base para a definição das concentrações a testar: 0 mg/L (ctl); 1,30 mg/L; 2,25 mg/L e 3,90 mg/L. O pesticida tebuconazol está descrito na bibliografia como bastante tóxico para *Daphnia magna*, e com baixa solubilidade (Cuco et al., 2016; Cuco et al., 2017). Assim, as concentrações de tebuconazol definidas para o presente estudo foram: 0 mg/L (ctl); 125 $\mu\text{g/L}$; 250 $\mu\text{g/L}$ e 500 $\mu\text{g/L}$. Estas concentrações foram selecionadas a partir de valores conhecidos da bibliografia do EC_{50} destes tóxicos para *Daphnia magna*.

2.2. Organismo-modelo

Daphnia sp. são pequenos crustáceos planctónicos que pertencem à classe Branchiopoda, ordem Cladocera, e que se caracterizam por possuir pequenos apêndices espalmados em forma de folha (toracópodes), que usam para criar uma corrente de água direcionada, que lhes permite filtrar partículas alimentares (Ebert, 2005). Outra característica importante é a presença de uma carapaça (exosqueleto) bivalve e de dois pares de antenas, um dos quais lhe permite nadar com movimentos irregulares. O género *Daphnia* contém mais de 100 espécies conhecidas que ocorrem

em diversos ecossistemas de água doce. Podem ser observados em habitats de águas paradas, à exceção de ambientes extremos (como por exemplo termas), desde grandes lagos até piscinas temporárias. São constituintes importantes do zooplâncton (consumidores primários), sendo mesmo elementos dominantes em alguns locais. A sua reprodução depende das condições ambientais e da população. Caso sejam favoráveis, estas reproduzem-se assexuadamente (partenogénese) e criam uma população constituída apenas por fêmeas. Caso as condições sejam desfavoráveis, *Daphnia* origina machos, que irão reproduzir-se sexuadamente com as fêmeas, dando origem a ovos de resistência ou *ephippia* (Antunes, 2001; Ebert, 2005).

Daphnia magna é um dos organismos-modelo amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos. *D. magna* é considerada um organismo-modelo pelas vantagens que apresenta, nomeadamente na sua facilidade de se manter em condições laboratoriais, o tipo de reprodução que apresenta (assexuada, por partenogénese) que permite criar uma cultura de clones geneticamente iguais, ciclo de vida curto e com altos valores de fecundidade, e grande sensibilidade a inúmeros fatores de stress, nomeadamente a tóxicos (Zhang & Baer, 2000; Cuco et al., 2016).

As culturas de *Daphnia magna* foram mantidas em condições laboratoriais padronizadas (ASTM 1980; USEPA 2002). *D. magna* foi cultivada em laboratório em meio de cultura sintético “ASTM hard water” (Tabela 1) sob condições controladas de temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuridão, numa câmara climática.

Tabela 1 – Composição química do meio de cultura sintético “ASTM Hard Water” (ASTM, 1980)

Fórmula Química	Quantidade de composto para solução stock (g/L)	Quantidade de composto para 2 L de solução concentrada (g)	Volume de solução concentrada para 20 L de meio de cultura (mL)	Concentração final de sais no meio de cultura (g/L)
1- NaHCO_3	19,20	38,40	200	0,192
2 - $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24,57	49,14	200	0,246
3 - KCl	0,80	1,69	200	0,008
4 - $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (*)	2,40	Prepara no momento		0,12
Tiamina HCl (B_1)	0,150/100 mL	Um microtubo com 1 mL da mistura de vitaminas guardado no congelador		0,000075
Cianocobalamina (B_{12})	0,002/100 mL			0,00000075
Biotina (H)	0,0015/100 mL			0,000001

O meio de cultura utilizado na manutenção de *D. magna* é relativamente pobre em nutrientes. Assim, e de modo a adicionar elementos essenciais à cultura de *D. magna*, foi adicionado um aditivo orgânico, com origem na alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Nunes et al., 2014; Antunes et al., 2007). Os organismos foram alimentados com uma suspensão da microalga verde *Raphidocelis subcapitata* numa concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL/dia. Esta foi cultivada em laboratório em meio de cultura “Woods Hole MBL” (Stein et al., 1973), durante uma semana com exposição contínua de luz (Antunes, 2001; Freches, 2015; Rodrigues, 2015).

Daphnia magna foi mantida em culturas de grupo com 25 a 30 indivíduos da mesma idade, em frascos com 500 mL de meio ASTM (ASTM, 1980). O meio de cultura foi renovado de 2 em 2 dias, transferindo cada grupo de organismos para novos frascos com meio de cultura limpo, extrato de alga e alimento. As culturas foram renovadas, ou iniciados ensaios, com os neonatos nascidos entre a 3ª e a 5ª ninhada.

2.3. Primeira Fase Experimental: efeito isolado de solventes

Os procedimentos laboratoriais para a realização dos ensaios crónicos seguiram as normas do protocolo padronizado da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD 2012).

Numa primeira fase experimental, foram realizados ensaios crónicos para os dois solventes selecionados (etanol e acetona) com as concentrações de 0 µL/L (ctl); 12,5 µL/L; 25 µL/L; 50 µL/L; 100 µL/L; 200 µL/L e 400 µL/L. Os solventes foram adicionados sempre que houve renovação do meio, de forma a manter-se a sua concentração durante todo o ensaio. Os ensaios foram realizados com neonatos com menos de 24 horas de vida, nascidos entre a terceira e a quinta ninhada. O ensaio consistiu na exposição de 10 organismos individualizados por concentração num volume final de 50 mL. As condições de ensaio foram semelhantes às descritas para a manutenção de culturas, mas neste caso o meio e o aditivo orgânico foram renovados de 2 em 2 dias e a alimentação foi diária. Os organismos foram observados diariamente ao longo da duração total do ensaio (21 dias), e foram registados os seguintes parâmetros: mortalidade (%), idade à primeira reprodução (dia), output reprodutivo (descendentes produzidos por fêmea inicial), taxa de crescimento somático (dia^{-1}) e taxa de incremento populacional (r , dia^{-1}). No início do ensaio foram medidos 20 neonatos (sub-amostra), provenientes da mesma cultura-mãe, para se registar o tamanho médio dos organismos no início do ensaio. No final do ensaio, todos os organismos expostos

foram medidos e registado o tamanho final. Assim foi possível calcular a taxa de crescimento somático de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de crescimento somático} = \frac{\ln(\text{Tamanho final}) - \ln(\text{Tamanho inicial})}{\text{Duração do ensaio (dias)}}$$

A sobrevivência e a fecundidade foram ainda utilizadas na computação da taxa de incremento populacional (r) pela equação de Euler-Lotka:

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x$$

onde, r é a taxa de incremento populacional (dia^{-1}), x é a classe de idade em dias, l_x é a probabilidade de sobrevivência à idade x e m_x é a fecundidade na idade (Meyer *et al.*, 1986).

2.4. Segunda Fase Experimental: efeito interativo entre etanol e tóxicos selecionados

Na segunda fase experimental, foram realizados ensaios crónicos (OECD, 2012) com os dois tóxicos selecionados (paracetamol e tebuconazol) e o solvente (etanol). Este último foi escolhido tendo em conta os resultados obtidos na primeira fase experimental. O procedimento experimental nestes ensaios foi idêntico ao descrito anteriormente, com neonatos com menos de 24 h individualizados em 10 frascos de 50 mL para cada concentração. No entanto, o desenho experimental nestes ensaios foi distinto, na medida em que aqui se utilizou um desenho bifatorial, cruzando todas as combinações de concentração de tóxico e concentração de solvente. O tóxico foi dissolvido em meio de cultura ou em etanol, conforme o tratamento experimental (ver abaixo). Relativamente à concentração de solvente utilizado em cada ensaio, foram testadas as seguintes concentrações de etanol: 0 $\mu\text{L/L}$ (ctl), 25 $\mu\text{L/L}$ e 100 $\mu\text{L/L}$ de etanol. No ensaio de exposição ao paracetamol, as concentrações testadas foram de 1,30 mg/L, 2,25 mg/L e 3,90 mg/L. No ensaio com o tebuconazol, as concentrações testadas foram de 125 $\mu\text{g/L}$, 250 $\mu\text{g/L}$ e 500 $\mu\text{g/L}$. As condições de manutenção do ensaio foram idênticas às descritas anteriormente para os ensaios realizados apenas com os solventes. Os parâmetros medidos foram os mesmos descritos anteriormente para os ensaios com os

solventes: mortalidade (%), idade à primeira reprodução (dia), output reprodutivo, taxa de crescimento somático (dia^{-1}) e taxa de incremento populacional (r , dia^{-1}).

De modo a efetuar corretamente o doseamento de solvente e tóxico, as soluções-teste de paracetamol e tebuconazol foram preparadas diretamente em meio de cultura (combinação das várias soluções de tóxico para 0 $\mu\text{L/L}$ de etanol) ou através de soluções stock em etanol. Para os tratamentos com etanol, foi preparada uma solução em etanol concentrada 40.000 \times (concentração final de etanol 25 $\mu\text{L/L}$) ou 10.000 \times (concentração final de etanol 100 $\mu\text{L/L}$). Nestes casos, as soluções-teste foram preparadas através de dosagem do meio de cultura a partir das soluções stock em etanol.

2.5. Análise Estatística

Os parâmetros obtidos nos ensaios crónicos (idade à primeira reprodução, *output* reprodutivo, taxa de crescimento somático e taxa de incremento populacional), foram analisados recorrendo à análise de variância (ANOVA). Previamente, foi avaliado o ajuste do modelo linear (ANOVA) aos dados, tendo-se concluído que este não era inferior a outro tipo de modelos (Poisson, binomial negativo) teoricamente mais apropriados para contagens (no caso da idade à primeira reprodução e *output* reprodutivo). Como tal, prosseguiu-se a análise com o modelo linear geral, que faz a partição da variância (ANOVA) assumindo uma distribuição dos resíduos próxima da normalidade.

Na primeira fase experimental, os resultados foram analisados estatisticamente recorrendo a uma análise de variância (ANOVA) unifatorial de forma a avaliar o efeito da concentração de solvente (etanol e acetona) nos parâmetros reprodutivos e populacionais de *D. magna*. Sempre que se registaram diferenças significativas foi realizado um teste de Dunnett de modo a identificar as diferenças relativamente ao grupo controlo.

Para os ensaios realizados com os tóxicos e o solvente, procedeu-se à análise estatística dos dados através de ANOVAs bifatoriais, de forma a avaliar se o efeito dos tóxicos dependia da presença do solvente (etanol). Utilizou-se uma soma de quadrados tipo II e apenas se analisaram os efeitos dos fatores individuais (solvente e/ou tóxico) na ausência de interação significativa. Quando se observou um efeito significativo de um ou dos dois fatores, recorreu-se ao teste de Dunnett para detetar efeitos significativos entre as diferentes concentrações em relação ao controlo. No caso de

haver uma interação significativa entre o efeito do tóxico e o solvente, recorreu-se à avaliação dos efeitos simples do tóxico para cada concentração de etanol.

Para todas as análises estatísticas, o grau de significância adotado foi 5% ($p \leq 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1. Primeira Fase Experimental: efeito isolado de solventes

A Figura 1 apresenta os resultados da avaliação do efeito dos solventes etanol e acetona na história de vida de *D. magna*. De acordo com os critérios de validação para ensaios crónicos, os ensaios foram válidos uma vez que a média de neonatos nascidos no controlo durante o ensaio foi superior a 60 neonatos (OECD, 2012). Mais ainda, no decorrer dos ensaios não foi registada mortalidade no controlo nem nos tratamentos. Quanto aos resultados da história de vida de *D. magna* após exposição aos solventes, não foram observadas quaisquer diferenças significativas nos parâmetros idade à primeira reprodução, output reprodutivo, taxa de crescimento somático e taxa de incremento populacional para ambos os solventes (Figura 1 e Tabela 2).

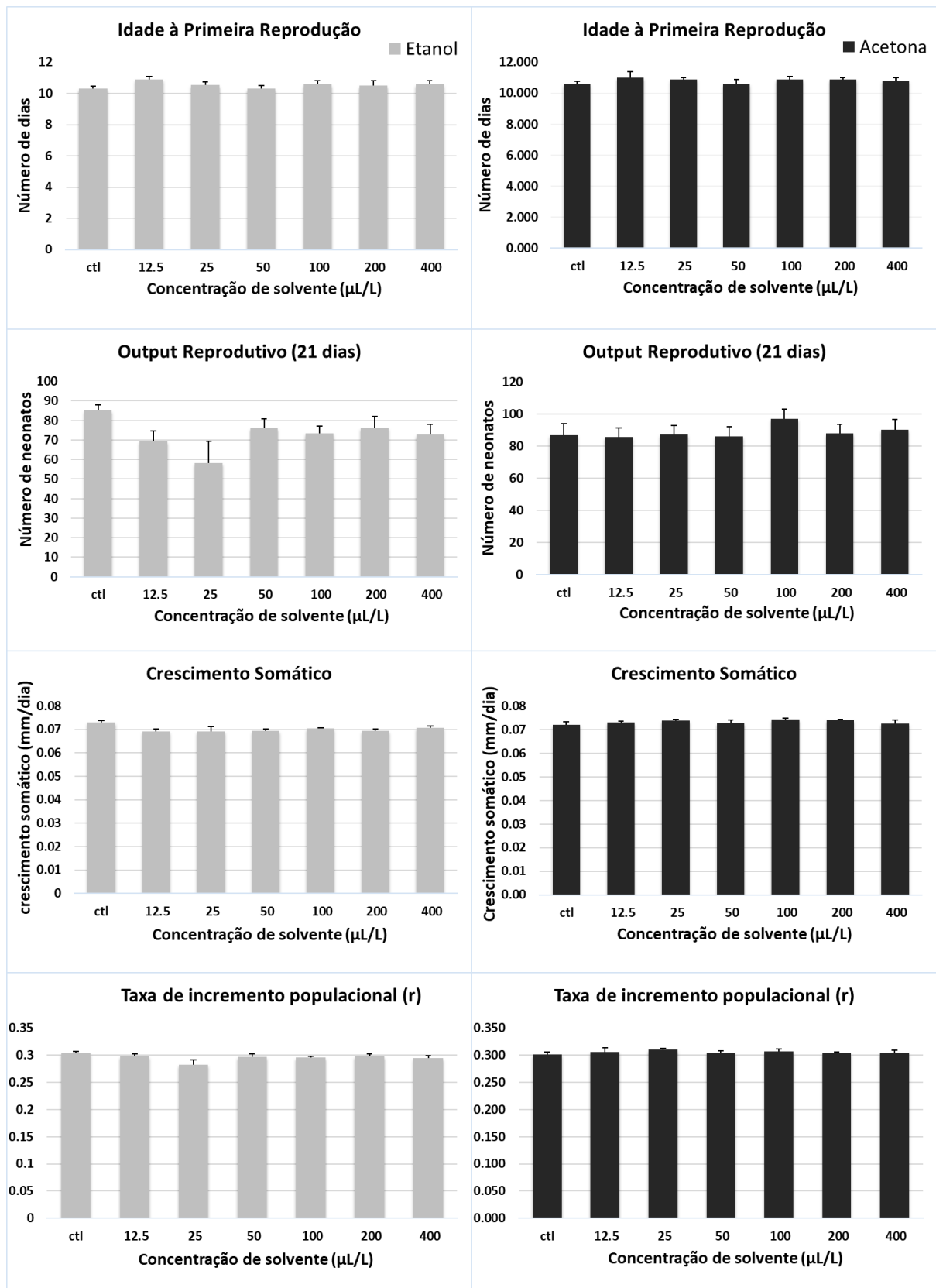


Figura 1 – Resultados dos parâmetros de história de vida de *Daphnia magna* após exposição crónica (21 dias) aos solventes etanol e acetona. As barras de erro representam o erro-padrão.

Tabela 2 – Sumário da ANOVA unifatorial efetuada aos parâmetros de história de vida de *D. magna* exposta aos solventes testados (g.l. – graus de liberdade; F – valor do teste de F; *p* – probabilidade).

Solvente	Parâmetro	g. l.	F	P
Acetona	Idade à primeira reprodução	6, 62	0,486	0,816
	Output Reprodutivo	6, 62	0,373	0,893
	Taxa de Crescimento Somático	6, 61	0,737	0,622
	Taxa de Incremento Populacional (<i>r</i>)	6, 62	0,363	0,900
Etanol	Idade à primeira reprodução	6, 61	0,828	0,553
	Output Reprodutivo	6, 60	1,884	0,098
	Taxa de Crescimento Somático	6, 57	2,196	0,057
	Taxa de Incremento Populacional (<i>r</i>)	6, 60	1,442	0,214

3.2. Segunda Fase Experimental: efeito interativo entre etanol e tóxicos selecionados

As Figuras 2 e 3 apresentam o resultado do efeito dos compostos paracetamol e tebuconazol na história de vida de *D. magna*, em duas situações distintas: dissolvidos em etanol (com duas concentrações distintas deste solvente) ou dissolvidos diretamente no meio de cultura (0 µL/L etanol). Os ensaios cumpriram os critérios de validação de acordo com o protocolo OECD (2012), uma vez que a média de neonatos nascidos no controlo durante o ensaio foi superior a 60 neonatos e não foi registada mortalidade no controlo nem nos tratamentos testados.

Relativamente ao ensaio com paracetamol, observaram-se diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados apenas para o fator solvente (etanol) (Tabela 3). No caso do output reprodutivo e taxa de incremento populacional, ocorreu uma ligeira estimulação na concentração de etanol mais alta (100 µL/L) (Figura 2). No entanto, na idade à primeira reprodução e na taxa de crescimento somático essas diferenças significativas não foram relativas ao tratamento controlo (Figura 2). Não foi registado qualquer efeito do paracetamol nas respostas avaliadas e para a gama de concentrações testada. Também não se verificou qualquer influência do solvente nas respostas de *Daphnia* ao paracetamol (interação não significativa, Tabela 3).

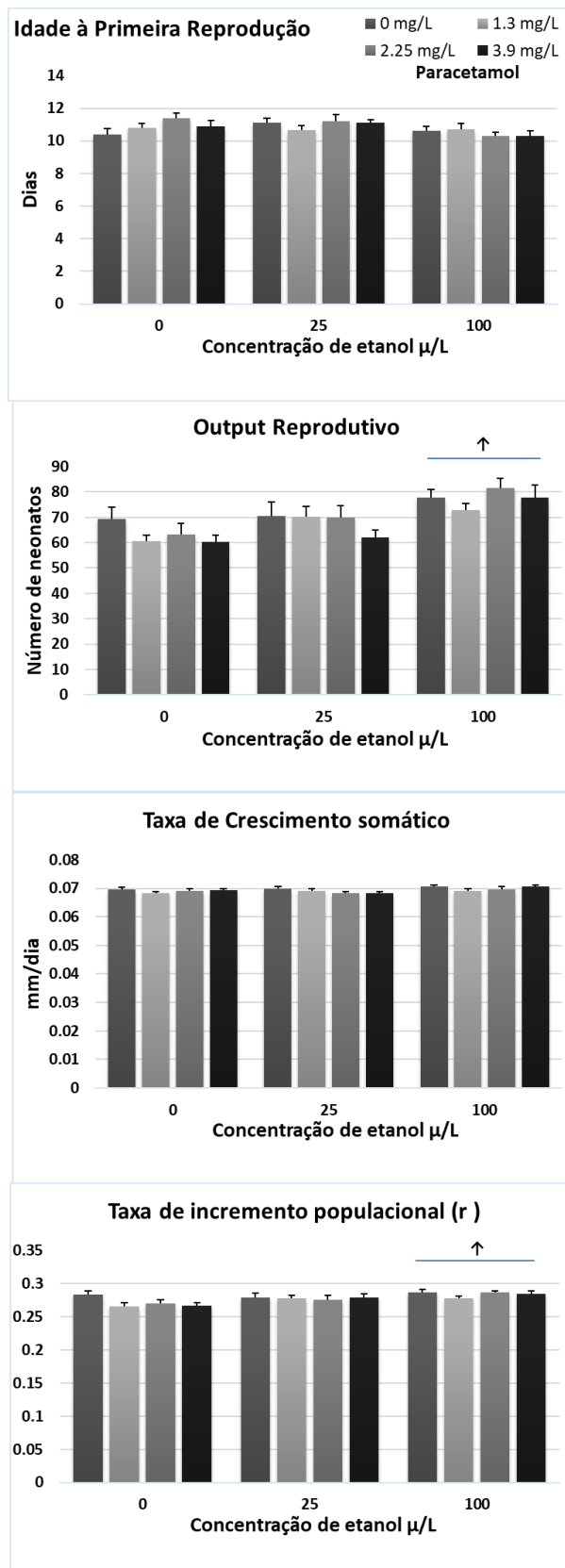


Figura 2 – Resultados dos parâmetros da história de vida de *D. magna* após exposição crónica (21 dias) a paracetamol com ou sem dissolução em etanol. As barras de erro representam o erro-padrão e as setas (↑ ou ↓) revelam diferenças significativas entre concentrações de etanol ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Sumário da ANOVA bifatorial efetuada aos parâmetros da história de vida de *D. magna* após exposição a paracetamol e etanol (g.l. – graus de liberdade; F – valor do teste de F; *p* – probabilidade). A negrito estão representadas as diferenças significativas ($p < 0,05$).

Parâmetro	Parâmetro	g. l.	F	P
Idade à Primeira Reprodução	Paracetamol	3, 107	0,454	0,715
	Etanol	2, 107	3,37	0,038
	Paracetamol x Etanol	6, 107	1,17	0,330
Output Reprodutivo	Paracetamol	3, 107	1,58	0,198
	Etanol	2, 107	13,5	<0,001
	Paracetamol x Etanol	6, 107	0,759	0,604
Taxa de Crescimento Somático	Paracetamol	3, 107	2,12	0,102
	Etanol	2, 107	3,69	0,028
	Paracetamol x Etanol	6, 107	0,734	0,623
Taxa de Incremento Populacional	Paracetamol	3, 107	1,84	0,144
	Etanol	2, 107	6,22	0,003
	Paracetamol x Etanol	6, 107	0,777	0,589

No ensaio com tebuconazol, a taxa de crescimento somático não foi significativamente afetada por nenhum dos fatores testados (tebuconazol ou etanol, Figura 3 e Tabela 4). Ao contrário deste parâmetro, registou-se um decréscimo significativo no output reprodutivo e na taxa de incremento populacional, quando analisados os dois fatores (tebuconazol e etanol, Tabela 4). Essas diferenças registaram-se quando os organismos foram expostos à concentração mais alta do tóxico (500 $\mu\text{g/L}$), independentemente da concentração de etanol; houve também um decréscimo nestes parâmetros quando os organismos teste foram expostos a etanol na concentração mais alta (100 $\mu\text{L/L}$, Figura 3), independentemente da concentração do tóxico. Na idade à primeira reprodução, registou-se uma interação entre o tóxico e o solvente (Tabela 4). Este foi o único caso em que a presença ou ausência do solvente interferiu com a interpretação da toxicidade do composto. De facto, registou-se um atraso significativo da idade à primeira reprodução quando os organismos foram expostos à concentração máxima de tóxico (500 $\mu\text{g/L}$) na ausência (0 $\mu\text{L/L}$) e na presença (25 $\mu\text{L/L}$) de etanol (Figura 3). Contrariamente, registou-se uma antecipação da idade à primeira reprodução quando os organismos foram expostos à concentração mais baixa de tebuconazol (125 $\mu\text{g/L}$), na presença da concentração mais alta de etanol (100 $\mu\text{L/L}$, figura 3). O significado biológico do observado nas concentrações mais baixas de etanol (atraso de desenvolvimento devido ao tebuconazol) e na mais alta (efeito incipiente) é diferente e produz conclusões toxicológicas também distintas.

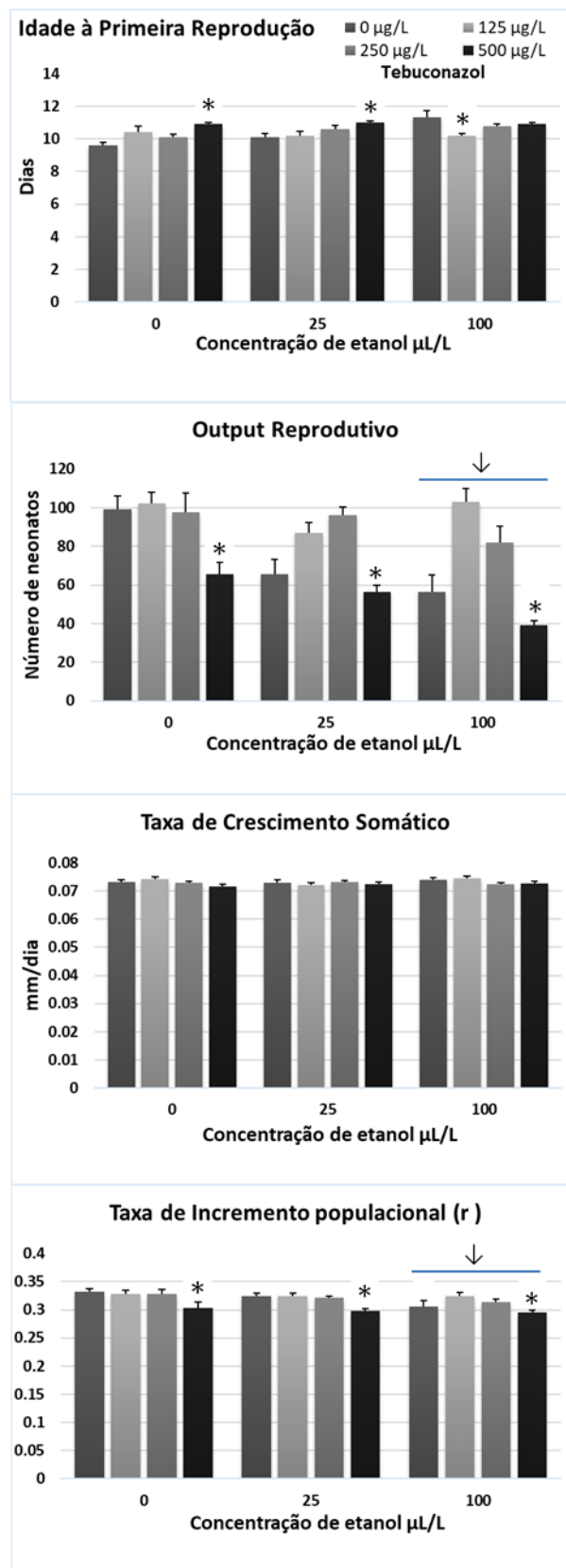


Figura 3 – Resultados dos parâmetros da história de vida de *D. magna* após exposição crónica (21 dias) a tebuconazol com ou sem dissolução em etanol. As barras de erro representam o erro-padrão e as setas (↓ ou ↑) revelam diferenças significativas entre concentrações de etanol, ao passo que os asteriscos (*) denotam diferenças relativamente ao ctl (ausência de tóxico) ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Sumário da ANOVA bifatorial efetuada aos parâmetros da história de vida de *D. magna* após exposição a tebuconazol e etanol (g.l. – graus de liberdade; F – valor do teste de F; *p* – probabilidade). A negrito estão representadas as diferenças significativas ($p < 0,05$).

Parâmetro	Parâmetro	g. l.	F	<i>p</i>
Idade à Primeira Reprodução	Tebuconazol	3, 108	4,57	-
	Etanol	2, 108	5,19	-
	Tebuconazol x Etanol	6, 108	3,41	0,004
Output Reprodutivo	Tebuconazol	3, 107	28,0	<0,001
	Etanol	2, 107	4,00	0,021
	Tebuconazol x Etanol	6, 107	1,56	0,165
Taxa de Crescimento Somático	Tebuconazol	3, 106	1,56	0,202
	Etanol	2, 106	0,718	0,490
	Tebuconazol x Etanol	6, 106	1,04	0,406
Taxa de Incremento Populacional	Tebuconazol	3, 107	9,76	<0,001
	Etanol	2, 107	4,09	0,020
	Tebuconazol x Etanol	6, 107	0,566	0,757

4. DISCUSSÃO

Segundo o protocolo OECD (2012), pode-se recorrer a solventes para a dissolução de compostos hidrofóbicos desde que não se ultrapassasse um limite estipulado de 0,1 mL/L de solvente. Segundo a bibliografia, este assunto é controverso, uma vez que existem estudos que demonstram que esta concentração de solvente é suficiente para provocar efeitos significativos sobre os organismos expostos (Cowgill & Millazo, 1991; Zhang & Baer, 2000; Hutchinson et al., 2006) e outros estudos demonstram o contrário (Leblanc & Suprenant, 1983; Comber et al., 1993). Analisando os resultados obtidos no presente estudo é possível observar que quando *Daphnia magna* foi exposta apenas aos solventes, etanol ou acetona, não se registaram alterações significativas para todos os parâmetros de história de vida analisados, mesmo a concentrações até 400 µL/L. Estes resultados vêm corroborar os resultados obtidos por Leblanc & Suprenant (1983) e Comber et al. (1993) que também não verificaram efeitos em *Daphnia magna* até uma concentração de 1400 µL/L e até uma concentração de 90 µL/L, respetivamente, ambos utilizando acetona. No presente estudo, as duas concentrações mais altas usadas ultrapassaram o limite imposto pelo protocolo OECD. Assim, e numa primeira análise, os resultados sugerem que estes solventes são seguros nas concentrações testadas.

Contrariamente a estes resultados, Cowgill & Millazo (1991) provaram que utilizando concentrações semelhantes às do protocolo OECD, o etanol dificultava a alimentação de *Daphnia magna*, criando efeitos ligeiramente tóxicos na produção de neonatos, no tamanho dos ovos e no tamanho dos indivíduos. Pelo contrário, Zhang & Baer (2000) mostraram que o número total de ninhadas, o número total de neonatos e o número total de fêmeas aumentavam significativamente no controlo de etanol e acetona (0,010 e 0,10 mL/L, respetivamente) comparativamente ao controlo sem solventes. Hutchinson et al. (2006) reviram vários artigos sobre os possíveis efeitos de solventes em várias espécies aquáticas e admitiram que o etanol provoca algum efeito tóxico na reprodução de *Daphnia magna* especificamente no output reprodutivo na concentração recomendada (100 µL/L), apesar de se desconhecer o mecanismo que desencadeia tal efeito. Estas contradições, que resultam provavelmente de uma resposta dependente do contexto ou da variabilidade natural, foram também verificadas no contraste entre a primeira e a segunda fase experimental desta dissertação. Efetivamente, nos ensaios com os dois tóxicos foi possível verificar efeitos significativos do solvente, que variaram entre um aumento ou uma diminuição da reprodução e da taxa de crescimento populacional (i.e., os efeitos foram inconsistentes). Esta variabilidade nos resultados resulta numa possível “confusão” na interpretação destes

resultados, e à dúvida quanto à toxicidade da substância que queremos testar, e que poderá estar “mascarada” nesse efeito causado pelo etanol.

No nosso estudo, quando *Daphnia magna* foi exposta a paracetamol, este tóxico não causou qualquer efeito significativo. Kim et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes; até a uma concentração de 5,72 mg/L inclusive, não houve qualquer efeito na reprodução de *Daphnia magna* exposta 21 dias a paracetamol, valor que ultrapassa os valores utilizados no estudo presente. Oliveira et al. (2016) elaborou ensaios agudos e crónicos em *Daphnia magna* utilizando paracetamol e não verificaram qualquer alteração nos parâmetros de vida deste organismo para concentrações dentro das utilizadas neste estudo (0,2 até 1,25 mg/L), a não ser um pequeno aumento na taxa de incremento populacional na concentração baixa (0,2 mg/L), algo que não foi verificado no nosso estudo. Mas já pelo contrário, Nunes et al (2014) utilizando concentrações superiores de paracetamol às utilizadas neste estudo (4,0 até 17,8 mg/L) observaram um decréscimo na taxa de incremento populacional e na reprodução a partir de valores superiores a 1,7 mg/L, o que ainda entra na gama de concentrações encontradas no presente estudo. Kim et al. (2012) também estudaram os efeitos da exposição de paracetamol noutro cladóceros, *Moina macrocopa*, sendo que o número de neonatos por ninhada foi bastante afetado de forma adversa a partir de concentrações de 0,95 mg/L. Estes resultados variam de estudo para estudo, dado a natureza de resposta toxicológica (que funciona através de níveis de exposição), as condições que podem condicionar a toxicidade do paracetamol, de espécie para espécie e até dentro da mesma espécie em condições experimentais diferentes, sendo difícil produzir dados toxicologicamente consistentes sobre o paracetamol (Nunes et al., 2012). Isto leva a incertezas tanto em limites a estipular a nível de mercado, como a potenciais efeitos a nível de ecossistemas (Nunes et al., 2012). Neste estudo, não foi observada nenhuma interação entre o paracetamol e o etanol, no entanto a possibilidade ainda existe para este tóxico e outros solventes ou até mesmo para outros produtos farmacêuticos e solventes como o etanol. Há ainda também a possibilidade de que as condições não tenham sido propícias para uma potencial interação entre estas duas substâncias.

Quando *Daphnia magna* foi exposta a tebuconazol, este tóxico provocou efeitos significativos tanto no output reprodutivo como na taxa de incremento populacional, sempre na concentração mais alta (500 µL/L; Tabela 4; Figura 3). Apesar destes efeitos serem esperados tendo em conta as evidências presentes na literatura (Cuco et al., 2016; Cuco et al., 2017), houve ainda uma interação entre o tóxico e o etanol para a idade à primeira reprodução (Tabela 4; Figura 3). Esta interação traduziu-se num atraso na idade à primeira reprodução causado pelo tebuconazol, mas que apenas foi

perceptível na presença de baixas concentrações de etanol; pelo contrário, na concentração mais alta de etanol este efeito não foi detetado. Curiosamente, nesta concentração de etanol (100 µL/L) verificou-se um valor mais elevado da idade à primeira reprodução observada no controlo. Apesar de não se ter observado um efeito significativo no controlo para o etanol nesta concentração, este pequeno atraso na idade à primeira reprodução pode ter sido responsável pela ausência de efeito do tebuconazol observada nesta concentração de etanol. Pode também ter sido responsável pelo efeito contrário observado para a concentração mais baixa de tebuconazol (125 µg/L) nesta concentração de etanol (100 µL/L). Ou seja, pode ter havido um efeito indireto no controlo do etanol, que causou diferenças significativas quanto à toxicidade do tóxico quando comparada a este mesmo controlo. Este é o tipo de efeitos que podem gerar confusão e dúvida, levando a interpretações de um efeito claramente significativo (para 0 e 25 µL/L de etanol) na idade à primeira reprodução, ou um efeito incipiente no caso da concentração mais alta de etanol (e que parece resultar de um efeito “silencioso” do etanol na ausência do tóxico). Num estudo com um disruptor endócrino, Zhang et al. (2003) também verificou um efeito interativo entre etanol e 4-nonilfenol em *D. magna*, tendo registado diferenças no rácio sexual na presença de ambas, algo que não era verificado quando apenas o tóxico estava presente.

Como podemos verificar nesta tese e no artigo de Zhang et al. (2003) é possível haver um cenário interativo entre tóxicos e os solventes utilizados. O grave desta situação é que, embora de forma subtil, a perceção do investigador pode levá-lo a concluir que há diferenças onde na realidade não existem, ou vice-versa. Por outro lado, o solvente pode efetivamente aumentar a toxicidade do composto testado (efeito sinérgico) ou anular o efeito tóxico deste (efeito antagónico), confundindo assim os potenciais toxicológicos da substância que pretendemos testar. Neste estudo em concreto, deparámo-nos com um possível efeito indireto do solvente no controlo do etanol que leva a um não efeito observado quando o tóxico é comparado a esse controlo. Green & Wheeler (2013) e Green (2014), reviram a utilização de comparações a nível estatístico entre os resultados obtidos com apenas o controlo do solvente, ou com os dois controlos (negativo e o controlo do solvente), e hipotetizaram que a melhor comparação estatística a fazer é de facto comparar os resultados apenas ao controlo do solvente, apesar de no nosso estudo levantar alguma “confusão” nos resultados. É, portanto, necessário estudar de forma mais aprofundada esta possível interação entre solventes e compostos tóxicos de forma a perceber se esta interação acontece regularmente, ou se apenas acontece com determinados solventes e/ou tóxicos. Também é necessário efetuar estudos com outros compostos que já se saiba os seus

efeitos (como por exemplo disruptores endócrinos) para se comprovar estes possíveis efeitos interativos.

Para além disso, são necessárias algumas recomendações, que vários autores já têm vindo a fazer. A primeira seria a cautela na utilização de solventes, e se for possível, a não utilização destes. Green & Wheeler (2013) sugerem métodos alternativos à utilização de solventes, como por exemplo, colunas de saturação, sonicação ou grandes volumes de soluções stock aquosas saturadas (métodos físicos que são também recomendados pelo protocolo OECD 2012 quando possíveis e de forma a evitar o usos de solventes), mas estes próprios admitem que muitas vezes estes métodos tornam-se de difícil execução e têm várias desvantagens em relação aos solventes, por exemplo a estabilidade das concentrações do tóxico. Sendo assim, por vezes torna-se inevitável utilizar solventes. Hutchinson et al. (2006) recomendam para estes casos baixar a concentração estipulada no protocolo de 100 $\mu\text{L/L}$ para uma concentração de apenas 20 $\mu\text{L/L}$ de forma a proteger os ensaios dos possíveis efeitos dos solventes. De facto, neste estudo pudemos comprovar que a concentração estipulada pelo protocolo OECD (100 $\mu\text{L/L}$) causou de facto efeitos nos organismos teste, tanto apenas com o solvente, como em interação com o tóxico tebuconazol. Assim, recomenda-se, tal como Hutchinson et al. (2006) evitar utilizar-se concentrações de etanol perto da concentração atualmente definida como limite máximo nos protocolos da especialidade.

5. CONCLUSÃO

Os resultados não nos permitem concluir com certeza se os solventes provocam efeitos sobre os organismos expostos, e se o limite estipulado é de facto protetor ou demasiado alto. Para além disso, pode haver efeitos interativos entre solventes e os tóxicos em teste, o que altera os resultados, podendo levar à conclusão de que estão a ser observados efeitos que não correspondem à verdadeira toxicidade da substância a testar, levando a incertezas na interpretação dos resultados. Isto prova que devemos ter bastante cautela na utilização de solventes em testes ecotoxicológicos. Os resultados aqui apresentados demonstram que é recomendável evitar utilizar concentrações de etanol perto do limite estabelecido pelo protocolo OECD (100 µL/L) em ensaios com *Daphnia magna*, de forma a evitar esta fonte de “confusão”. Mais estudos necessitam de ser feitos no sentido de se compreender melhor o possível efeito provocado pelos solventes nos resultados de testes crónicos e para se compreender também estes possíveis efeitos interativos entre solventes e tóxicos.

6. BIBLIOGRAFIA

- Antunes, S.C. (2001). Variabilidade clonal de respostas crónicas de *Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares. Tese de Mestrado em Ciências das Zonas Costeiras da Universidade de Aveiro. Pp. 90.
- Antunes, S., Pereira, R., Gonçalves, F. (2007). Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environment Contamination and Toxicology*, 53, 207-213.
- ASTM (1980). Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. In Report E 729-80 (Philadelphia: American Society for Testing and Materials).
- Artigas, J., Majerholc, J., Foulquier, A., Margoum, C., Volat, B., Neyra, M., Pesce, S. (2012). Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquatic toxicology*, 122, 197-205.
- ASTM (1980) Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E 729-80. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Berenzen, N., Lentzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M. (2005). A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere*, 58(5), 683-691.
- Carvalho, F.P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & policy* 9, 685-692.
- Comber, M.H.I., Williams, T.D., Stewart, K.M. (1993). The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Research*, 27(2), 273-276.
- Cowgill, U.M., & Milazzo, D.P. (1991). The Sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* to seven chemicals utilizing the three-brood test. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20(2), 211-217.
- Cuco, A.P., Abrantes, N., Gonçalves, F., Wolinska, J., Castro, B.B. (2016). Toxicity of two fungicides in *Daphnia*: is it always temperature-dependent? *Ecotoxicology*, 25, 1376-1389.
- Cuco, A.P., Abrantes, N., Gonçalves, F., Wolinska, J., Castro, B.B. (2017). Interplay between fungicides and parasites: Tebuconazole, but not copper, suppresses infection in a *Daphnia-Metschnikowia* experimental model. *PLoS ONE*, 12(2), e0172589.
- Duffus, J.H. (1980). *Environmental Toxicology*. Edward Arnold (Publishers) Ltd.

- Ebert, D. (2005). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. National Library of Medicine.
- Forbes, V.E., and Forbes, T.L. (1994). Ecotoxicology in theory and practice, Vol 2 (Springer Science & Business Media).
- Freches, A.R. (2015). Efeitos ecológicos de substâncias químicas: uma nova perspectiva sobre velhas ferramentas. Tese de Mestrado em Ecologia, Ambiente e Território da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Pp. 50.
- Granberg, R.A., & Rasmuson, Å.C. (1999). Solubility of paracetamol in pure solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 44(6), 1391-1395.
- Green, J.W. & Wheeler, J., (2013). The use of carrier solvents in regulatory aquatic toxicology testing: practical, statistical and regulatory considerations. *Aquatic Toxicology*, 144-145, 242–249.
- Green, J.W. (2014). Power and control choice in aquatic experiments with solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, 142-146.
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J., Zhang, X., Giesy, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Toxicology*, 98(3), 256-264.
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S. (2011). Field-scale dissipation of tebuconazole in a vineyard soil amended with spent mushroom substrate and its potential environmental impact. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), 1480-1488.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J. (1995). *Handbook of Ecotoxicology* (Boca Raton, Florida: CRC Press).
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B. (2006) Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquatic Toxicology*, 76, 69–92.
- ISO (1996). Water quality: determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – acute toxicity test. In ISO International Standard 6341 (Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization).
- ISO (2000). Water quality: determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). In ISO International Standard 10706 (Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization).
- Kahle, M., Buerge, I.J., Hauser, A., Muller, M.D., Poiger, T. (2008). Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environmental Science & Technology*, 42(19), 7193-7200.

- Kast-Hutcheson, K., Rider, C.V., LeBlanc, G.A. (2001). The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3), 502-509.
- Kim, P., Park, Y., Ji, K., Seo, J., Lee, S., Choi, K., Kho, Y., Park, J. Choi, K. (2012). Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere*, 89(1), 10-18.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic waste water contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36(6), 1202–1211.
- LeBlanc, G. A., & Surprenant, D. C. (1983). The acute and chronic toxicity of acetone, dimethyl formamide, and triethylene glycol to *Daphnia magna* (Straus). *Archives of Environmental Contamination and toxicology*, 12(3), 305-310.
- Leoni, B., Bettinetti, R., Galassi, S. (2008). Sub-lethal effects of acetone on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 17(3), 199-205.
- Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L., Boyce, M.S. (1986). Estimating Uncertainty in Population-Growth Rates - Jackknife Vs Bootstrap Techniques. *Ecology* 67, 1156-1166.
- Moriarty, F. (1983). *Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems* (London: Academic Press).
- Newman, M.C. (2009). *Fundamentals of ecotoxicology* (CRC press).
- Nunes, B., Antunes, S.C., Santos, J., Martins, L., Castro, B.B. (2014). Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 178-185.
- OECD (2012). *Daphnia magna* Reproduction Test. In OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) Test No 211 (Paris (France): OECD Publishing).
- Oliveira, L. L. D., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., Nunes, B. (2016). Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, 39(1), 13-21.
- Pascoe, D., Karntanut, W., Müller, C.T. (2003). Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, 51(6), 521-528.
- Pimentel, D. (1996). Green revolution agriculture and chemical hazards. *Science of the Total Environment*, 188, S86-S98.
- Rand, G.M., & Petrocelli, S.R. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications* (FMC Corp., Princeton, NJ).

- Roberts, P.H., & Thomas, K.V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 356, 143-153.
- Rodrigues, M.O. (2015). Técnicas laboratoriais em Ecologia e Ecotoxicologia aquática. Relatório de estágio da Licenciatura de Biologia da Universidade de Aveiro. Pp. 39.
- Sancho, E., Villarroel, M.J., Ferrando, M.D. (2016). Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 10-17.
- Silveira, S.B. (2012). Toxicidade do tebuconazol em quatro espécies fitoplanctónicas dulciaquícolas subtropicais. Dissertação de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande. Pp. 57.
- Stein, J.R., Hellebust, J.A., Craigie, J. (1973). *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*, Vol 2 (Cambridge University Press).
- Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32, 3245-3260.
- Toni, C., Loro, V.L., Santi, A., Menezes, C.C., Cattaneo, R., Clasen, B.E., Zanella, R. (2011). Exposure to tebuconazol in Rice Field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, part C, 153:128-132.
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, 151-173.
- Zhang, L. & Baer, K.N. (2000) The influence of feeding, photoperiod and selected solvents on the reproductive strategies of the water flea, *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 110, 425–430.
- Zhang, L., Gible, R., Baer, K.N. (2003) The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 330–337.
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Schulz, R. (2010). Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1674-1680.
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Feckler, A., Englert, D., Schulz, R. (2011). Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(12), 2718-2724.